

PCT/JP2004/010664

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

06.08.2004

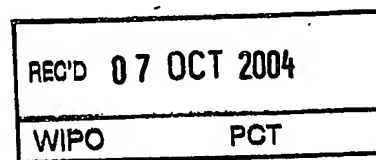
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   7 月 3 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 2 0 4 2 4 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 3 - 2 0 4 2 4 9 ]

出 願 人      萬有製薬株式会社  
Applicant(s):

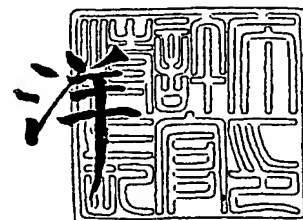


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   9 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 3 5 8 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 0326

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 小谷 秀仁

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 板谷 啓

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 水洗 慎司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 荒木 啓充

【特許出願人】

【識別番号】 000005072

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町 2 丁目 2 番 3 号

【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社

【代表者】 長坂 健二郎

【電話番号】 (03)3270-3222

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013077

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

**【書類名】 明細書****【発明の名称】** Slc25a10による肥満治療に有効な化合物の評価方法**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、

該被検化合物が、該被検動物又は該被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

**【請求項2】** 被検化合物を、Slc25a10遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を有する被検動物又は被検細胞に接触させる工程と、

該レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルを測定する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

**【請求項3】** 被検化合物を、Slc25a10タンパク質に接触させる工程と、

該被検化合物が、該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

**【請求項4】** 請求項1～3のいずれか一項に記載の評価方法によって得られた化合物を有効成分として含有する肥満の治療又は予防剤。

**【請求項5】** 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

**【請求項6】** 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

**【請求項7】** 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする肥満の検査方法。

**【請求項8】** Slc25a10タンパク質と相互作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は該タンパク質の活性を検出すること、を特徴とする肥満の検査方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、Slc25a10遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法に関する。また、本発明は、前記遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の検査方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

肥満は、高血圧症、糖尿病、高脂血症、虚血性心疾患等に代表される種々の成人病の危険因子である。また、これらの多くは慢性疾患であることから、将来的には医療費の高騰の原因になると考えられ、社会的にも大きな問題となっている。

#### 【0003】

このような肥満を防止するために抗肥満薬の開発が進められており、現在では、食欲抑制剤や脂質吸収阻害剤が臨床的に利用されている。ここで、抗肥満薬研究の標的分子としては、これまでにレプチン、PPAR $\gamma$ 、ニューロペプチドY等が知られているが、肥満の原因は非常に多様であるため、創薬標的として作用機序の異なった標的分子が待望されている。

#### 【0004】

また、このような肥満状態あるいはその原因を適切に診断することは、その後の適切な治療にとって不可欠であるため、簡便で精度の高い肥満マーカーの出現が望まれている。また、近年、投与した薬剤の効果が被投与者の遺伝子多型等の遺伝子型に影響を受ける現象が見出されており、薬剤の開発段階における臨床試験やいわゆるオーダーメイド医療において、分子レベルでの検査や診断のマーカーが待望されている。

#### 【0005】

一方、Slc25a10は、ミトコンドリアの内膜に存在する輸送タンパク質のグループに属する6回膜貫通型のタンパク質であることが知られており、これまでに、ラット及びマウスの遺伝子(GenBank Accession No. NM\_013770：配列番号1)のクローニングに関する報告(J. Biol. Chem. 273(38), 24754-24759 (1998)：非特許文献1)及びヒト遺伝子(GenBank Accession No. NM\_012140：配列番号2)のクローニングに関する報告がある(Biochem. J. 344, 953-960 (1999)：非特許文献2)。

## 【0006】

非特許文献2において、マウスを寒冷下に晒した場合に肥満細胞中のSlc25a10の発現量が低下すること、マウス3T3-L1細胞をインシュリン処理した場合にSlc25a10の発現量が低下すること、同細胞を遊離脂肪酸中で培養した場合にSlc25a10の発現量が上昇することが明らかにされている。

## 【0007】

## 【非特許文献1】

Giuseppe Fiermonte, et al., J. Biol. Chem. 273(38), 24754-24759 (1998)

## 【非特許文献2】

Kallol Das, et al., Biochem. J. 344, 953-960 (1999)

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、Slc25a10と肥満あるいは体重との相関についてはこれまでになんら知見がなく、体重をコントロールする化合物等についての知見も全くないのが現状であった。

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供することを目的とする。また、分子レベルで判断可能な肥満の検査方法を提供することを目的とする。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、Slc25a10遺伝子の発現量と体重との間には一定の相関関係があることを見出し、本発明を完成した。

## 【0010】

すなわち、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、当該被検化合物が、当該被検動物又は当該被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する工程とを含むこと

を特徴とする。

また、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被験化合物を、Slc25a10遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を有する被検動物又は被検細胞に接触させる工程と、該レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルを測定する工程とを含むことを特徴とする。

#### 【0011】

さらに、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化合物を、Slc25a10タンパク質に接触させる工程と、当該被検化合物が、当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする。

#### 【0012】

また、本発明の肥満の検査方法は、被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする。

#### 【0013】

さらに、本発明の肥満の検査方法は、被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする。

#### 【0014】

また、本発明の肥満の検査方法は、被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする。

#### 【0015】

さらに、本発明の肥満の検査方法は、Slc25a10タンパク質と相互作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は当該タンパク質の活性を検出することを特徴とする。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

#### 【0017】

先ず、本発明にかかる用語について説明する。

本発明における「発現レベル」とは、Slc25a10遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子は、DNA又はmRNAのいずれをも含む。また、

発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、Slc25a10遺伝子の翻訳産物の絶対量又は相対量をいう。

また、本発明における「被検動物」としては、その種は特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルが挙げられる。

#### 【0018】

また、本発明における「被検組織」とは、肥満検査を行う際に生体から抽出可能な組織であればその種類は特に限定されないが、肥満の影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝臓組織、脂肪組織、筋肉組織、血液組織であることが好ましい。また、組織の単離が容易であるとの観点から、前記組織の中でも血液組織であることが好ましい。ここで、これらの組織の由来となる動物種については特に制限されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

#### 【0019】

また、本発明における「被検細胞」についても、肥満の検査を行う際に生体から抽出可能な細胞であれば、その種類は特に限定されないが、肥満の影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝細胞、脂肪細胞（白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞等）、筋肉細胞（筋芽細胞、骨格筋細胞平滑筋細胞等）、膵細胞（膵島細胞等）、血球細胞であることが好ましい。ここで、かかる組織の由来となる動物種については特に限定されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

#### 【0020】

さらに、本発明における「肥満」とは、脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義される一般的な肥満に加え、これに糖尿病や高血圧等の合併症又は内臓脂肪が伴う、いわゆる「肥満症」も含む。また、本発明における「肥満」は、薬物投与等による体重のコントロールを受けた場合に、もとの体重と比較して相対的に体重が増加した状態をも意味する。

#### 【0021】

また、本発明における「検査」とは、肥満であることを単に判断するのみならず、将来的な肥満を予測する場合をも含む。



## 【0022】

次に、本発明にかかるSlc25a10について説明する。

Slc25a10は、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに存在し、熱産生に關与するUCPファミリーと36～38%程度の相同性を有する。

ここで、UCPは、ミトコンドリアにおいて熱の産生を引き起こすタンパク質である。具体的には、グルコースや脂肪酸が酸化されることによって生じたプロトンが、呼吸鎖酵素群によってミトコンドリア内膜から膜外に放出され、その結果、プロトン勾配が生じる。UCPは、プロトンを内膜内に運ぶチャネルとして機能し、かかるプロトン勾配を解消する。その結果、内膜内のプロトンによって脂肪酸等の酸化が亢進し、熱産生を促す。すなわち、UCPは、生体内のエネルギーの消費を促進する機能を有している。

## 【0023】

本発明者らは、上述のSlc25a10とUCPとの相同性の高さに反して、Slc25a10がミトコンドリアにおける熱産生においてUCPとは逆の活性を有することを見出した。すなわち、Slc25a10は、ミトコンドリア内膜に存在し、内膜の内外間のプロトン勾配を上昇せしめる活性を有し、その結果、熱産生をせずにエネルギーを蓄積する機能を有する。従って、Slc25a10の機能を阻害することによりエネルギー消費が亢進され、肥満の解消に寄与するものと、本発明者らは考えている。

## 【0024】

(1) 本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法

被検化合物を被検動物や被検細胞に投与、接触させることにより変動するSlc25a10遺伝子の発現量を測定したり、被検化合物をSlc25a10タンパク質に接触させて当該タンパク質の活性に及ぼす影響を検討することにより、当該被検化合物の評価を行うことが可能となる。

## 【0025】

すなわち、このような被検化合物の中には、細胞や組織に作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現レベルやSlc25a10タンパク質の活性を正常化あるいはコントロールし、脂肪の蓄積や食欲のコントロール等、肥満の原因となるメカニズムの正常化を図ることができるものがあると考えられる。従って、以下に説明す

るような評価方法により、肥満の治療薬又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

#### 【0026】

(A) Slc25a10遺伝子の発現レベル調節能を指標とする評価方法

被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させ、当該被検化合物が被検動物又は被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認することにより、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

#### 【0027】

具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。

#### 【0028】

まず、被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させる。ここで、被検化合物としては、肥満の治療又は予防薬の候補化合物であれば、その構造や性質は問わず、化合物種も限定されない。

#### 【0029】

被検化合物を被検動物に投与する方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、経口投与、非経口投与（例えば、経皮投与、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射）が挙げられる。また、被検化合物を被検細胞に接触させる方法としても特に制限はなく、具体的には、例えば、培養液や緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し両者を接触させる方法が挙げられる。

#### 【0030】

次に、被検化合物が被検動物又は被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する。

#### 【0031】

前記遺伝子の発現レベルの調節の有無の確認法としては、特に制限はなく、前述の投与又は接触の前を対照とし、当該遺伝子の発現量の変化をRT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイを用いる方法又はノーザンハイブリダイゼーション法等によって検出することにより実施することができる。また、前記遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を人為的に導入した動物又

は細胞を用いてもよい。この場合、レポーター遺伝子としては、具体的には、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子又はグリーンフルオレッセンスプロテイン遺伝子が挙げられる。

#### 【0032】

ここで、「Slc25a10遺伝子と機能的に等価な遺伝子」とは、Slc25a10遺伝子と塩基配列は異なるものの、比較的高い相同性を示し、Slc25a10と同じ又は類似の活性を有する遺伝子を示す。ここで、前記相同性は、機能的に等価であれば特に制限はないが、塩基配列の相同性が70～100%であることが好ましく、80～100%であることがより好ましく、90～100%であることが特に好ましい。相同性が前記下限より低い場合には、Slc25a10と同じ又は類似の機能を示さない可能性が高い傾向にある。しかしながら、塩基配列の相同性が前記下限未満であっても、Slc25a10に特有の機能を有するドメインと、当該ドメインに対応する塩基配列との相同性が高い場合にはSlc25a10遺伝子と同様又は類似の機能を有する場合がある。このような遺伝子は、塩基配列の相同性が前記範囲外であっても好適に使用可能である。また、比較的高い相同性の高い遺伝子とは、Slc25a10遺伝子における1又は2以上の塩基が自然若しくは人工的に置換、欠失、不可及び／又は挿入した遺伝子であってもよい。

#### 【0033】

##### (B) Slc25a10タンパク質の活性を指標とする評価方法

被検化合物をSlc25a10タンパク質に接触させ、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認することにより、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

#### 【0034】

具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。

#### 【0035】

まず、被検化合物をSlc25a10タンパク質に接触させる。

#### 【0036】

このようなタンパク質と被検化合物を接触させる方法としては、特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し接触さ

せる方法が挙げられる。

#### 【0037】

次に、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する。タンパク質の活性測定における条件は、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよい。このような条件としては、具体的には、例えば、Slc25a10タンパク質の場合には、ミトコンドリア内膜の内外間のプロトン勾配の変化等を指標とすることができ、例えば、Yu XX et al, Biochem.J (2001) 353, 369-375

を参照して行うことができる。

#### 【0038】

以上説明したような本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法により、肥満の治療薬や診断薬のスクリーニングや、これらの薬剤の有効性又は安全性の評価、さらには、オーダーメイド治療における適切な薬剤の選択が可能となる。

#### 【0039】

##### (2) 本発明の肥満又は痩せの検査方法

(A) Slc25a10遺伝子の発現レベルを測定することによる肥満又は痩せの検査方法

被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体（例えばヒト）が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的に肥満になるか否かを予測することも可能である。

#### 【0040】

以下に、このような検査の具体的な方法について説明する。

#### 【0041】

先ず、検査対象となる生体より被検組織又は被検細胞を抽出する。このような抽出の方法としては特に制限はなく、公知の方法により抽出することができる。

#### 【0042】

次に、抽出された被検組織又は被検細胞から発現レベルの測定の対象となる遺

伝子を調製する。Slc25a10遺伝子の発現レベルを測定するには、先ず、被検組織又は被検細胞からSlc25a10のRNA (total RNA又はmRNA) を調製する必要がある。このようなRNAの調製は、公知の方法によって行うことができるが、例えば、Molecular cloning A LABORATORY MANUAL 2nd EDITION (1989) (T. Maniatis著: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 7.3-7.36を参照して行うことができる。こうして調製したRNAを用いて、例えば、RT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイ (例えば、Affymetrix社製DNAチップ) を用いる方法、ノーザンハイブリダイゼーション法により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いたインサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization) 等により、その発現量を測定することもできる。

#### 【0043】

また、Slc25a10遺伝子の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量が増加すると予測される期間の前後 (例えば、肥満治療薬の投与の前後) について行い、発現量の差を測定すればよい。

#### 【0044】

具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したSlc25a10遺伝子の発現量が増加すると予測される期間の前後で、その発現レベルが有意に上昇した場合に、体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとして診断できる。一方、前記発現レベルが減少した場合に体重の減少があった又は将来的に減少する可能性があるとして診断できる。

#### 【0045】

(B) Slc25a10タンパク質の発現レベルを測定することによる肥満又は痩せの検査方法

被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体 (例えばヒト) が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満状態を検査するのみならず、将来的に肥満又は痩せになりうるかを予測することも可能である。

#### 【0046】

以下、このような検査の具体的な方法について説明する。

#### 【0047】

タンパク質の発現レベルを測定する方法としては、生体から単離したタンパク質を定量する方法やタンパク質の血中濃度を測定する方法があり、具体的な方法としては特に限定されない。

#### 【0048】

生体から単離したタンパク質を定量する方法の具体例としては、以下のとおりである。まず、被検組織又は被検細胞からSlc25a10タンパク質を調製する。このようなタンパク質の調製は、公知の方法によって行うことができる。こうして調製したタンパク質から、例えば、プロテインチップ（例えば、CIPHERGEN社製プロテインチップシステム）を用いる方法、免疫学的方法（例えば、ELISA、EIA法、ウエスタンブロッティング法）により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いた免疫染色等によって、その発現量を測定することもできる。一方、タンパク質の血中濃度を測定する方法の具体例としては、生体から採取した血液を用いて、上記免疫学的方法等により、Slc25a10タンパク質を定量する方法が挙げられる。

#### 【0049】

以上のようにして、Slc25a10の遺伝子又はタンパク質の発現レベルを測定した後、その結果を解析することにより、被検体が肥満か又は痩せであるかを検査できる。すなわち、本発明より、Slc25a10タンパク質の発現レベルと体重は一定の相関関係を有することが明らかにしたため、上記検査結果と対照群（健常人等）におけるSlc25a10タンパク質の発現量とを比較することにより、肥満の程度を判断することが可能となる。また、本発明の検査方法によれば、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的な肥満又は痩せの可能性の予測も可能となる。

#### 【0050】

また、Slc25a10タンパク質の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量に変化すると予測される期間の前後（例えば、肥満治療薬の投与の前後）について行い、発現量の差を測定すればよい。

## 【0051】

具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したSlc25a10タンパク質の発現量が変化すると予測される期間の前後で、その発現レベルが有意に上昇した場合に体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとして診断できる。

## 【0052】

(C) Slc25a10遺伝子の遺伝的多型を検出する肥満又は痩せの検査方法

Slc25a10遺伝子に遺伝的多型が存在する場合、その多型の有無や種類によりSlc25a10遺伝子又はタンパク質の発現レベルが変化したり、当該タンパク質の活性に異常が生じる場合がある。従って、このような遺伝的多型を検出することによりSlc25a10の発現や活性に関する知見を得、さらに、被検組織や被検細胞の由来となった被検体の肥満の検査を行うことができる。このような遺伝的多型としては、具体的には、例えば、ミニサテライト、マイクロサテライト、SNP(single nucleotide polymorphism：一塩基多型)が挙げられる。

## 【0053】

Slc25a10遺伝子における多型の検出は以下のようにして行うことができる。すなわち、Slc25a10遺伝子において、その発現量を制御する領域を検査対象となる肥満の被検体を対象として塩基配列を決定し、多型部位を検出する。検出された多型部位の対立遺伝子頻度を算出し、被検体集団において有意に増加又は減少している対立遺伝子を見出すことにより肥満と相関する多型を同定する。このようにして検出された遺伝的多型は、例えば、被検体由来のゲノムDNAについて、多型部位の塩基配列の解析、多型部位に存在する塩基の種類に依存して変化するDNAの物理化学的性質の差や制限酵素部位の相違を利用する方法、当該多型部位の検出に適当な検出用プローブを利用する方法及び質量分析法を利用した方法等によって臨床的に検出可能である。

## 【0054】

(D) Slc25a10タンパク質と相互作用することによりSlc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は活性を検出することによる肥満又は痩せの検査方法

生体内において、多くのタンパク質は他のタンパク質と相互作用することによ

り、所定の生理機能を発揮する。Slc25a10についても同様に、例えば、その発現を制御する転写因子等の作用を受けることにより発現量が制御され、所定の機能を発揮している。Slc25a10タンパク質と、当該Slc25a10タンパク質と相互作用することによりSlc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量やその活性とは一定の相関関係を有し、いずれか一方の挙動を検出することにより、他方の挙動を推測できる関係にある。

#### 【0055】

ここで、「相互作用」とは、Slc25a10タンパク質と別のタンパク質が直接的又は間接的に作用することをいい、例えば、Slc25a10タンパク質が別のタンパク質と物理的に接触することによりアミノ酸の修飾等を生じるような作用や、第3のタンパク質を介して相互作用し、間接的にSlc25a10タンパク質の発現に影響を及ぼすような作用が挙げられる。このようなタンパク質としては、例えば、Slc25a10タンパク質を介するシグナル伝達において、Slc25a10タンパク質の上流又は下流で生理的機能を発揮するタンパク質が挙げられる。また、このようなタンパク質の発現量又は活性を検出する方法としては、対象となるタンパク質の種類に応じて好適な手段を適宜選択すればよく、具体的な手段としては特に限定されない。

#### 【0056】

以上の(A)～(D)で説明したような本発明の肥満の検査方法によって、分子レベルで肥満又は痩せの診断が可能となるばかりか、将来的に肥満又は痩せになる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、より確な診断が可能となる。

#### 【0057】

##### (3) 肥満又は痩せの治療、予防剤

Slc25a10遺伝子は、その発現量と体重とが相関関係を示す。従って、当該遺伝子の発現レベルを正常レベルへと調節する化合物は肥満の治療又は予防に有用であるのみならず、例えば、痩せ、糖尿病、高血圧症、高脂血症、虚血性心疾患にも応用可能である。このような化合物としては、上述したような本発明の化合物の評価方法によって選択された化合物が挙げられる。これらの化合物を薬剤とし



て使用するには、当該化合物を直接患者へ投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与することもできる。製剤化するに際し、薬理学上許容される担体若しくは媒体としては、具体的には、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、香料又は着色剤が挙げられる。また、このような医薬組成物を患者に投与する方法としては、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉的又は経口的な投与が挙げられる。医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢又は投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

#### 【0058】

##### (4) 肥満又は痩せの検査薬、検査キット

Slc25a10タンパク質の発現量は、肥満又は痩せに基づく体重変化と相関関係を有する。従って、当該タンパク質に対する抗体を使用して被検細胞や被検組織中のタンパク質量を検出、測定することにより、肥満又は痩せの検査を簡便に行うことができる。ここで、「抗体」とは、抗原であるSlc25a10遺伝子産物に結合する抗体分子全体又はその断片をいう。このような抗体は、公知の方法によって製造することができ、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。また、当該抗体を用いた免疫学的測定法としては、公知の方法を使用すればよく、具体的には、例えば、蛍光抗体法、酵素抗体法が挙げられる。

#### 【0059】

また、このような抗体を含んだキットを製造し、本発明を実施することも可能である。キットの構成としては、当該抗体に加え、例えば、抗体を検出するために蛍光標識やラジオアイソトープで標識された2次抗体や抗原抗体反応を行う際に使用する緩衝液を備えていてもよい。

#### 【0060】

このような肥満又は痩せの検査薬を使用することにより、分子レベルでの診断が可能となるばかりか、将来的に肥満又は痩せになる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、よりの確な診断が可能となる。また、本発明の肥満又は痩せの検査キットを使用することにより、前述したような的

確な診断を非常に簡便に実施することが可能となる。

#### 【0061】

##### 【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

(肥満モデル動物の作製)

##### 製造例 1

(ニューロペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) Y5 アゴニスト i.c.v. 投与マウス)

NPY Y5アゴニストを投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。

#### 【0062】

9～12週齢の雄マウス (C57BL/6J: クレア社製) は、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$  の条件下、1 プラスチックゲージに 1 匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは 12 時間とし、午前 7 時に点灯し、午後 7 時に消灯した。また、マウスには、飼料 (CE-2 (タンパク質: 25.4 重量%、炭水化物: 50.3 重量%、脂質: 4.4 重量%): クレア社製) と水を自由に摂取させた。

#### 【0063】

マウスは、80mg/kg ペントバルビタールナトリウム (ダイナボット社製) で麻酔をかけ、滅菌された 28 ゲージの脳注入カニューレ (アルゼ (Alzet) 社製) を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレはブレグマより後方へ 0.4mm、側方へ 0.8mm、深さ 2mm の位置に、頭蓋骨に対し垂直に固定した。カニューレは歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。カニューレは、0.05% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 10mM のリン酸緩衝液で満たした浸透圧ポンプ (モデルナンバー 2002: アルゼ社製) にポリビニルクロライドチューブで接続した。10mM PBS (0.05% BSA 含む) に D- $\text{Try}^{34}\text{NPY}$  (5 マイクログラム/日になるように調製) を溶解した溶液をポンプに満たした後、マウスの背中の皮下に埋め込み連続注入した。また、抗生物質 (50mg/kg のセファメジン (Cefamedine): 藤沢薬品製) を皮下注射した。

#### 【0064】

これらのマウスを、溶媒のみを注入し通常に摂食させたグループ (vehicle group)、D-Try<sup>34</sup>NPY (NPY Y5アゴニスト) を注入することによって摂食量を増加させ肥満にさせたグループ (ad lib fed group)、D-Try<sup>34</sup>NPY を注入したが摂食量は vehicle group と同量に摂食制限をかけたグループ (pair-fed group) に分けた。

#### 【0065】

##### 製造例 2

(MCH投与マウス)

MCH (melanin-concentrating hormone) を投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。

#### 【0066】

13週齢の雄マウス (C57BL/6J: クレア社製) は、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$  の条件下、1 プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは12時間とし、午前7時に点灯し、午後7時に消灯した。また、マウスには、飼料 (CE-2 (タンパク質: 25.4重量%、炭水化物: 50.3重量%、脂質: 4.4重量%): クレア社製) と水は自由に摂取させた。マウスが環境に適応した頃、飼料としてMHF (タンパク質: 15.0重量%、炭水化物: 52.4重量%、脂質: 32.6重量%、オリエンタルバイオサービス社製) を与えた。

#### 【0067】

マウスは、80mg/kg ペントバルビタールナトリウム (ダイナボット社製) で麻酔をかけ、滅菌された28ゲージの脳注入カニューレ (アルゼ (Alzet) 社製) を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレはプレグマより後方へ0.4mm、側方へ0.8mm、深さ2mmの位置に、頭蓋骨に対し垂直に固定した。カニューレは歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。カニューレは、30%プロピレングリコールで満たした浸透圧ポンプ (モデルナンバー2002: アルゼ社製) にポリビニルクロライドチューブで接続した。ポンプはマウスの背中の皮下に埋め込み、抗生物質を皮下注射した。

#### 【0068】

これらのマウスを、平均体重を一致させた3つのグループ（溶媒のみを注入したグループ（vehicle group）、MCHを注入したグループ（ad lib fed group）、MCHを注入しペアフィードとしたグループ（pair-fed group））に分けた。続いて、エーテル麻酔下で、ポンプをMCH(3マイクログラム/日)又は溶媒（30%プロピレングリコール）に置き換えた。

#### 【0069】

##### 製造例 3

(DIO(Diet induced obesity)マウス)

18週齢のマウス（C57BL/6J：クレア社製）は、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。このマウスに高カロリー食であるMHF（タンパク質：18.2重量%、炭水化物：55.6重量%、脂質：15.5重量%）を6ヶ月間に渡って与え、肥満を呈するモデルマウス（DIOマウス）を作製した。なお、実施例中、「established MFD」は、これ以上体重が増えないようになるまでMHFを与えて飼育したマウスを指す。

#### 【0070】

また、前記のマウスにMHFよりさらに高い脂肪を含有する高カロリー食であるHFD（タンパク質：20.8重量%、炭水化物：38.59重量%、脂質：32.88重量%）を与えたDIOマウス（HFD）も作製した。

#### 【0071】

##### 製造例 4

(食事制限をしたマウス)

マウス（C57BL/6N、17週齢）は1ケージに1匹ずつ個別に飼育した。また、エサは普通食(CA-1、CLEA)を与えた。

#### 【0072】

摂食制限は、以下のようなスケジュールで行った。すなわち、エサ(CA-1)を1日につき3時間（10:00～13:00）だけ与え、水は自由に摂取できるようにした。摂食時間の前後で餌の重量を測定し、その差を摂食量とした。また、摂食制限をしている期間は、体重、外見の観察等をモニターした。なお、条件付けに失敗したと思われるマウス（短期間に極度な体重減少（例えば20%程度の

減少)が見られるマウス)は実験には使用しなかった。かかる条件下でマウスを7日間飼育した後、白色脂肪細胞を摘出した。

### 【0073】

#### 実施例1～5及び比較例1～2

(白色脂肪細胞におけるSlc25a10の発現)

製造例1～4において製造したモデルマウスを用いて、その白色脂肪細胞(WAT)中のSlc25a10遺伝子の発現量を測定した。発現量の測定は、各モデルマウスの白色脂肪細胞から抽出したRNAを、mouse U74Aチップ(Affymetrix社製)及びmouse25K1.8チップ(Rossetta社製)を用いて処理することにより行った。

### 【0074】

非処理のC57BL/6Nの白色脂肪細胞におけるSlc25a10の発現量を1とした場合の、DIOマウス(DIO)、D-Try<sup>34</sup>NPY投与マウス(NPY(FF))、D-Try<sup>34</sup>NPY pair feeding投与群マウス(NPY(PF))、MCH投与マウス(MCH(FF))、MCH pair feeding投与群マウス(MCH(PF))、食事制限をしたマウス(Fasting)及びNPY Y5 antagonist投与マウス(Y5ant)におけるSlc25a10遺伝子の発現量を表1に示す。

表1より明らかなように、肥満モデルマウスではSlc25a10の発現量が増加し、食事制限をしたマウス及びNPY Y5 antagonistを投与したマウスでは、その発現量が低下していた。従って、NPY Y5 antagonistの発現量と体重とが相関関係を有していることが明らかとなった。

(表1)

|       | 肥満モデル         | Slc25a10 の発現量 |
|-------|---------------|---------------|
| 実施例 1 | DIO マウス       | 1.9           |
| 実施例 2 | NPY(PF)       | 1.9           |
| 実施例 3 | NPY(FF)       | 3.0           |
| 実施例 4 | MCH(PF)       | 2.4           |
| 実施例 5 | MCH(FF)       | 1.7           |
| 比較例 1 | Fasting       | 0.2           |
| 比較例 2 | Y5 antagonist | 0.77          |

## 【0075】

実施例 6

(Slc25a10とミトコンドリアプロトン勾配との関連)

Slc25a10と高い相同性を有するUCPは、ミトコンドリアの膜電位を変化させることにより、熱産生を行う。そこで、Slc25a10についてもミトコンドリアのプロトン勾配について検討した。

先ず、HEK293細胞を6wellプレートに $2 \times 10^6$ /wellの密度で播種した。24時間後、前記の細胞にpcDNA3.1ベクターにクローニングしたSlc25a10遺伝子を、リポフェクトアミン2000を用いて導入した。また、ネガティブコントロールとしてベクターのみを導入した細胞、並びに、ポジティブコントロールとしてマウスUCP1を導入した細胞及びヒトUCP3を導入した細胞を準備した。

## 【0076】

遺伝子を導入して48時間後にミトコンドリア勾配に感受性を示す試薬であるDiOC6(3-3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide)を用いて染色を行った。当該染色は、細胞を0.3マイクロモルDiOC6で20分間染色した後、PBSで2回洗浄することにより行った。なお、DiOC6は、プロトン勾配が高い場合には、ミトコンドリアに結合する量が多くなり、強い蛍光を発する。一方、プロトン勾配が低い場合には、ミトコンドリアに結合する量は減少し、蛍光強度は弱くなる。

## 【0077】

図1(a)は、細胞内ミトコンドリアプロトン勾配をuncouplingさせるCCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone)で処理したHEK293細胞をDiOC6で染色した後の共焦点顕微鏡写真であり、図1(b)は、HEK293細胞である。HEK293細胞では、細胞内ミトコンドリアが緑状のドットに染色されていることがわかる。一方、CCCP処理細胞では、蛍光強度が大きく低下していることがわかる。従って、ミトコンドリアがプロトン勾配特異的に染色されていることが確認できた。

## 【0078】

DiOC6の蛍光強度、すなわち、ミトコンドリアプロトン勾配の定量化は、以下の2つの方法により行った。

## 【0079】

## (1) フローサイトメーターによる解析

DiOC6で染色した細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、フローサイトメーター (Beckman Coulter社製: Epics Elite Flow Cytometer) (アルゴンレーザー: 488nm、バンドパスフィルター: 522nm) を用いてその蛍光強度を測定した。

## 【0080】

図2(a)~(c)に示すとおり、Slc25a10遺伝子を導入したHEK293細胞の蛍光強度を示すヒストグラムは、コントロールと比較してシフトしており、プロトン勾配が上昇したことが確認できた。なお、図2(a)はHEK293細胞をCCCP処理した場合の結果を示し、図2(b)は無処理のHEK293細胞 (Slc25a10遺伝子導入せず) を用いた場合の結果を示し、図2(c)はSlc25a10遺伝子を導入したHEK293細胞を用いた場合の結果を示す。また、表2に試料それぞれの蛍光強度平均値を示す。

(表2)

|       | サンプル名            | 蛍光強度平均値 |
|-------|------------------|---------|
| 図2(a) | CCCP 処理          | 5.4     |
| 図2(b) | Slc25a10 遺伝子導入せず | 16.8    |
| 図2(c) | Slc25a10 遺伝子導入   | 25.9    |

## 【0081】

## (2) フルオロメーターによる解析

DiOC6で染色した細胞をPBSで洗浄した後、溶解し、遠心分離することによって細胞抽出液を準備した。この細胞抽出液をフルオロメーター (Perseptive Biosystems社製: Cytofluor Series 4000 Fluorescent Multi Well Plate Reader) (Excitation:485nm、Emission:520nm) を用いて解析した。

## 【0082】

ベクターのみを導入したコントロール細胞の蛍光強度を100として、各試料の相対値を求めたところ、図3に示すとおり、マウスUCP1又はヒトUCP3を導入した細胞では20%程度のプロトン勾配の低下が観察されたのに対し、マウス又はヒトSlc25a10遺伝子を導入した細胞では20%程度のプロトン勾配の上昇が観察された。この結果より、Slc25a10のプロトン勾配に対する活性はUCPとは逆の作用

を有するものであり、その活性はUCPと同程度の強度であることが確認できた。

### 【0083】

#### 実施例 7

(Slc25a10遺伝子の発現)

脂肪組織、骨格筋、脾臓、肺、腎臓、脳、心臓、精巣、肝臓のmRNAがトランスファされたノーザン解析用のメンブレン (バイオチェーン社製、クロンテック社製) を用いて、Slc25a10遺伝子の発現部位の解析を行った。ここで、プローブとして<sup>32</sup>Pで標識されたマウスSlc25a10の全長cDNAを使用し、QuickHYB (ストラタジーン社製) を緩衝液としてハイブリダイゼーションを行った。

### 【0084】

図4(a)及び(b)に示すとおり、Slc25a10遺伝子は脂肪組織に非常に強く発現し、腎臓及び肝臓にも若干発現していることが確認された。

### 【0085】

#### 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の化合物の評価方法又は検査方法によれば、肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供することが可能となる。また、分子レベルで判断可能な肥満の検査方法を提供することが可能となる。

### 【0086】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> Evaluation method of the chemical compound which is effective to the obesity treatment with Slc25a10

<130> 0326

<160> 2



<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2021

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

|  |     |
|--|-----|
| cggacagggc gcattggctg taccgggcgc gggcgctcgg tagcactttg aaccgggcgt  | 60  |
| tgagcagctg ggaccggagt tgtgctcacc ggggtcgggc caggtcgctg ctgctctggc  | 120 |
| catggccgag gcacgcacgt ctcgctggta ctttggaggg ctggcttcct gcggagctgc  | 180 |
| ctgctgcacg caccctctag acctgctcaa ggtgcatttg cagacccaac aggaggtgaa  | 240 |
| gcttcgaatg actggattgg cactgcaggt ggtgcgaacc gatggcttcc tggcgtctta  | 300 |
| caacggcctg agtgcctcgc tgtgcaggca gatgacctac tctctgactc gggtcgcaat  | 360 |
| ctacgagacc atgcgggact acatgaccaa ggactcccag gggcctctcc ctttctacaa  | 420 |
| caaggtgttg ctgggcggca tcagtgtttt aactggaggc ttcgtgggga cccagcaga   | 480 |
| tttgggtcaat gtcaggatgc agaacgacat gaagctgccc ccgagccaac gacgcaacta | 540 |
| ctctcatgcc ctggatggtc tgtaccgtgt agcccgtgaa gaaagcctga ggaagctctt  | 600 |

ctctggagca actatggcgt ccagccgtgg ggccctcgtc actgtgggcc agctgtcctg 660

ctatgaccag gccaaagcaac tggtcctcag cactgggtac ctgagtgaca acatattcac 720

ccactttgtc tccagtttca ttgccggcgg atgtgccacg tttctgtgcc agcccctcga 780

tgtgctgaag actcgcctga tgaactccaa gggcgagtac cagggtgttt tccactgtgc 840

catggagaca gcaaagcttg gaccccaggc ctttttcaag ggtctctttc ccgcgggcat 900

ccgtctcacc cccacactg tgctcacttt catgttcctg gagcagcttc ggaagcactt 960

tggcatcaaa gtgccaacca cctgacatgg ccaggacac ctgggccagg ctcggtcgct 1020

gtgctgagct ccttgggaaga gtgggaaggg aacgggctct ctcccttggc ctgggccccat 1080

gttggtcccc agcaggctcc tgctcttccc tgccttgggc tgctggctat gccttccgac 1140

cctgccttgg cccactcaa gtggcacctc tgccctactt actcccaggc tctccccact 1200

gggtcacccc gtcttcctat ccgatgattc actcagaaga ggtctggcct ggctgggtgc 1260

actgtcccca cctccctggc tgctaccgtg ccctgcctgg caagcccagc gaagccgagt 1320

tcgtttcctg ctcccgctgg ccctctgtgc agggagcagt ttccgcccag aacttgggta 1380

gtgtggcagg gtacggcccc tggcagcttc tgcttaccaa atgactagag cacacacaca 1440

agcactttgt cacaagaggg accaccgtgc tgtgttctgg aaggtagtgc cttcaggaga 1500

ggggacaggc aggcagcgca gattaccagc agaagccatg accgtggagt ccagagaaaag 1560  
tgcctgggggt tcccagcgcg acctcctgta tgcagccttg gctgctctaa tggtcagttt 1620  
tgctgaaccc tcctgctcag cggctactgc cgtcaccagg aactgtctgt gtcctcaca 1680  
cgctgtgcc ctcccttgcc tggcttcccc agggccagggt gggcatgctg gcagagctgg 1740  
ggcagtgatg gattcatcgt ttgtgccctc ccaggacctg gcttcctgta tggcaggcat 1800  
cacccttcac catccctcag gcttcgaagc agcctgtttt ccctcaaagtg gggttgtgtg 1860  
tatcaaaacg aggttcggcc ctgtgcctcc cacaggtcct ccccaggaa gtggcagcag 1920  
cccaggggca ctgcctacac ctctcttcag gatctaataa accaagtggc ctgggaaaaa 1980  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2021

<210> 2

<211> 1969

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcacgaggc ggggcgcggg gcgctgcggc cggtacacgc cggggtaggg ccggggtcgg 60

gttgtgtcgc ggccgggatt gggctctcct gggccatggc agccgaggcg cgcggtgtcgc 120

gctggtactt cggggggctg gcctcctgcg gggccgcctg ctgcacgcac ccgctggacc 180

tgctcaaggt gcatctgcag acgcagcagg aggtgaagct gcgcatgacg ggcatggcgc 240

tgcggtggt gcgtaccgac ggcatcctgg cactctacag cggcctgagc gcctcgctgt 300

gcagacagat gacctactcc ctgactcggg tgcctatcta cgagactgtg cgggaccgtg 360

tggccaaggg cagccagggg cctctcccct tccacgagaa ggtgttgctg ggctccgtca 420

gcggttttagc tggaggcttc gtggggacgc ccgcagactt ggtcaacgtc aggatgcaga 480

acgacgtgaa gctgccccag ggtcagcggc gcaactacgc ccatgcgctg gatggcctgt 540

accgcgtagc tcgtgaagag ggtctcagga gactgttctc gggtgcaacc atggcatcca 600

gccgaggggc cttagtcact gtgggccagc tgtcctgcta cgaccaggcc aagcagctgg 660

tccttagcac cgggtacctc tctgacaaca tcttactca ctttgtcgcc agctttattg 720

caggtggatg tgccacgttc ctgtgccagc ccctggatgt gctgaagact cgcctgatga 780

actccaaggg ggagtatcag ggcgttttcc actgcgccgt ggagacagcg aagctcgggc 840

ctctggcctt ttacaagggc ctcgctccag ctggcatccg cctcatcccc cacaccgtgc 900

tcacttttgt gtttctggaa cagctacgca aaaactttgg catcaaagtg ccatcctgac 960

cagccgtggg aatggctggg ctgccaggcc agacacgcta ggttcttcca aagagtcca 1020

agcccagcac ctgtcctgg gccacgacc tccctggccg tggccaccg tcctccgag 1080

caggcccctg ctgtcccccc acctgtggc tgagctcctc ctggcctcgt cccctctcag 1140

ctgtagctgc accacccccg ctctggctac caggctctcc cggctgggca ctgcgtggcc 1200

ttgccctct cccgctggca gctcctcagg ggaacagggg ctaccagagg ctgatttctc 1260

ccctctcctg gccagggga ggggtattat ccctgcctcc tgccccgat gcccaaagca 1320

gcattctcca gcatttcca tcgaggactt ggggtggcaga gtgtgggtgc agcctggctg 1380

ttgtcaccc aagtgctagc tctgcacttc gtgtctgtg agagcaacca gacattccat 1440

gtcctcgggc agctgcaact cccgcgaga cccgcagct gggtaggatg aacaagcaac 1500

gcagaccaca agcgagtgcc tgggagggag tggcccaggg tggttctgga gccattgtg 1560

gtgagggctg agggccaccg aggtcccgcg caccgtgcc tgccctgcag tggctttaac 1620

agttagtttt gccaaagcct ctccactcac cagcaggcgg tctctgtctt cagggtattgt 1680

gcctgcgtcc ctccggcacc tgggcccccc cgcttggtc cctgggggaa tggcccaggc 1740

gggctgcggt tcctccttag ggccttctcc ccgacaagga gtccgacggg gcggatgctg 1800

catcctctgc ctccctggtc gctgggcttc acccacctg ggaagggcag tgtgctctgt 1860

gggggctgca atcaataaat gccgggagct gccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1969

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

図 1 (a) は、CCCP で処理した HEK293 細胞を DiOC6 で染色した場合の顕微鏡写真である。

図 1 (b) は、HEK293 細胞の顕微鏡写真である。

#### 【図 2】

Slc25a10 とミトコンドリアプロトン勾配との関係についてフローサイトメーターにより解析した結果を示す図である。

#### 【図 3】

Slc25a10 とミトコンドリアプロトン勾配との関係についてフルオロメーターにより解析した結果を示す図である。

#### 【図 4】

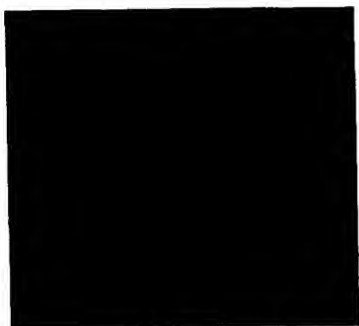
各組織における Slc25a10 遺伝子の発現量を示す図である。

【書類名】

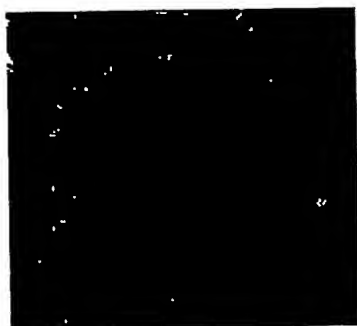
図面

【図 1】

(a)

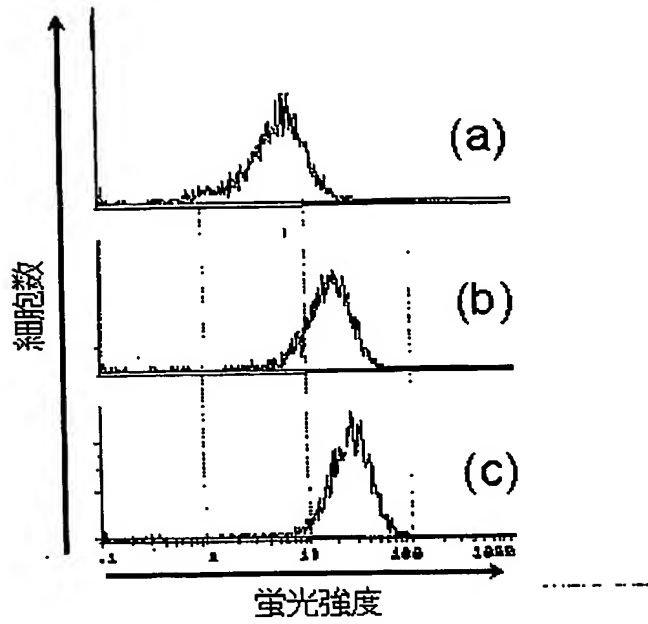


(b)



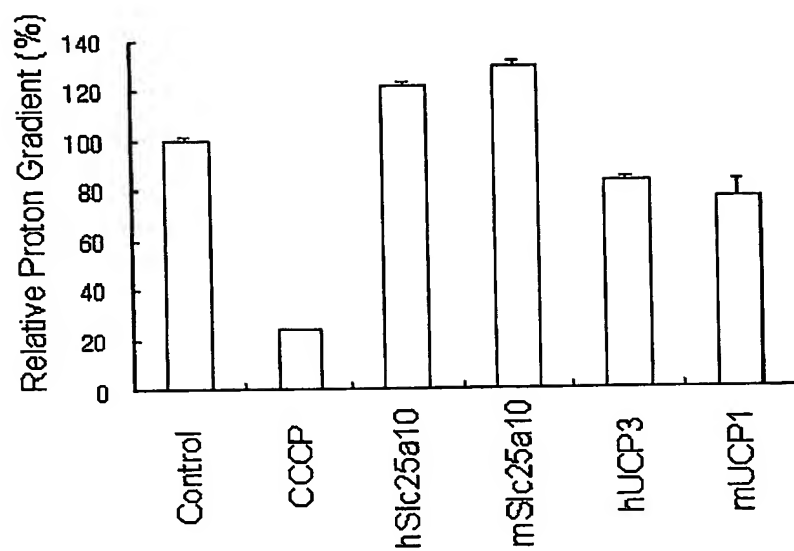
BEST AVAILABLE COPY

【図 2】

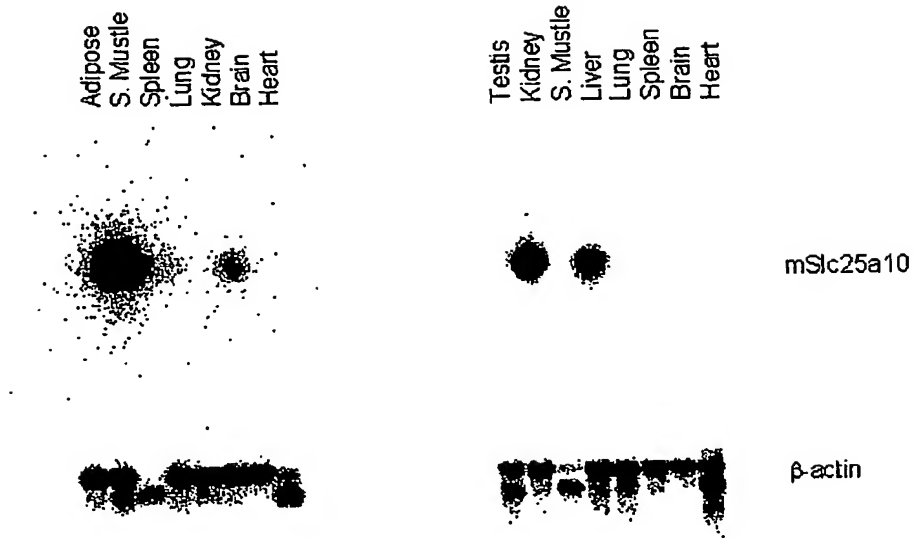




【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分子レベルで判断可能な肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供すること。また、肥満の検査方法を提供すること。

【解決手段】 肥満の肥満又は痩せの治療薬のスクリーニング等をはじめとする化合物の評価において、Slc25a10遺伝子又はタンパク質の被検組織又は被検細胞における発現レベルや、当該遺伝子又はタンパク質の性質を利用して当該評価をすること。また、肥満の検査において、Slc25a10遺伝子の発現量や当該遺伝子における多型等に基づいた検査をすること。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

|         |                |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-204249 |
| 受付番号    | 50301268392    |
| 書類名     | 特許願            |
| 担当官     | 第一担当上席 0090    |
| 作成日     | 平成15年 8月 1日    |

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

|       |             |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 7月31日 |
|-------|-------------|

特願 2 0 0 3 - 2 0 4 2 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 0 7 2 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町 2 丁目 2 番 3 号

氏 名

萬有製薬株式会社